



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | | |
|--|--|---|--|
| (51) 国際特許分類6 A61K 31/195, 9/08 | | A1 | (11) 国際公開番号 WO96/00059 |
| | | | (43) 国際公開日 1996年1月4日(04.01.96) |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01136 (22) 国際出願日 1995年6月7日(07.06.95)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平6/141998 1994年6月23日(23.06.94) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 西平哲郎(NISHIHIRA, Tetsuro)[JP/JP] 土井秀之(DOI, Hideyuki)[JP/JP] 〒980 宮城県仙台市青葉区青陵町1番1号 東北大学医学部内 Miyagi, (JP) 小松博道(KOMATSU, Hiromichi)[JP/JP] 〒399-46 長野県上伊那郡笑輪町大字中笑輪字南原14016 中外製薬株式会社内 Nagano, (JP)</p> | | <p>(74) 代理人 弁理士 湯浅恭三, 外(YUASA, Kyozo et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> | |
| <p>(54) Title : THERAPEUTIC AGENT FOR LIVER REGENERATION</p> <p>(54) 発明の名称 肝再生用治療剤</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A therapeutic agent for liver regeneration containing valine as the active ingredient. It can accelerate liver regeneration and recovery of normal liver functions of patients with hepatitis, fatty liver and drug-induced hepatic injury, and can induce early liver regeneration and rapid post-operative recovery of patients hepatectomized on account of gallbladder cancer, liver cancer and metastatic liver cancer.</p> | | | |

(57) 要約

バリンを有効成分として含有することを特徴とする肝再生治療剤は、肝炎、脂肪肝および薬剤性肝障害における肝障害に対し、肝再生を促し、正常な肝機能を回復させ、胆囊癌、肝癌、転移性肝癌等により肝切除を施行した患者に、早期に肝再生を誘導し、速やかに術後回復を可能にする

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|-----------|-------|-------------|----|------------------|----|------------|
| AL | アルバニア | DK | デンマーク | LK | スリランカ | PT | ポルトガル |
| AM | アルメニア | EE | エストニア | LR | リベリア | RO | ルーマニア |
| AT | オーストリア | ES | スペイン | LS | レソト | RU | ロシア連邦 |
| AU | オーストラリア | FI | フィンランド | LT | リトアニア | SD | スードアン |
| AZ | アゼルバイジャン | FR | フランス | LU | ルクセンブルグ | SE | スウェーデン |
| BB | バルバドス | GA | ガボン | LV | ラトヴィア | SG | シンガポール |
| BE | ベルギー | GB | イギリス | MC | モナコ | SI | スロヴェニア |
| BF | ブルキナ・ファソ | GE | グルジア | MD | モルドバ | SK | スロヴァキア共和国 |
| BG | ブルガリア | GN | ギニア | MG | マダガスカル | SN | セネガル |
| BR | ベナン | GR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラビア共和国 | SZ | スワジランド |
| BY | ブラジル | HU | ハンガリー | ML | マリ | TD | チャード |
| CA | ペラルーシ | I E | アイルランド | MN | モンゴル | TG | トーゴ |
| CF | カナダ | IS | イスランド | MR | モーリタニア | TJ | タジキスタン |
| CG | 中央アフリカ共和国 | IT | イタリー | MW | マラウイ | TM | トルクメニスタン |
| CH | コঙゴー | J P | 日本 | MX | メキシコ | TR | トルコ |
| CI | スイス | K E | ケニア | NE | ニジェール | TT | トリニダード・トバゴ |
| CM | コート・ジボアール | K G S | キルギスタン | NL | オランダ | UA | ウクライナ |
| CN | カメルーン | K P | 朝鮮民主主義人民共和国 | NO | ノルウェー | UG | ウガンダ |
| CZ | 中国 | K R | 大韓民国 | NZ | ニュージーランド | US | 米国 |
| DE | チェコ共和国 | K Z | カザフスタン | PL | ポーランド | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| | ドイツ | L I | リヒテンシュタイン | | | VN | ヴィエトナム |

明細書

肝再生用治療剤

5 技術分野

本発明は分岐鎖状アミノ酸であるバリンを有効成分として含有することを特徴とする肝再生治療剤、詳しくは、肝障害・肝炎・肝硬変等により、肝臓を切除した後等の肝細胞を再生させる作用を有するバリン含有製剤に関する。

10 背景技術

従来より、肝細胞再生作用を有する因子や薬剤は知られている。例えば、Archive of Pathology, 16, 226-231 (1993) には、肝の部分切除後に1%重量の甲状腺乾燥粉末を含んだ食餌を与え続けると、肝の部分切除後7日目から肝の重量が対照と比べて有意に増加することが記載されている。

また、Journal Biological of Chemistry, 247, 1757-1766 (1972) には、トリヨードチロニン(T3)、アミノ酸混液、グルカゴン、ヘパリンの混合液で肝臓にDNA合成がおこると報告されている。

さらに成熟ラット初代培養肝細胞の増殖因子として、70%部分肝切除後24時間のラット血清より精製され、HGF (Hepatocyte Growth Factor)あるいはヘパトロビン(Hepatotropin)と命名されたことがBiochemical and Biophysical Research Communications, 122, 1450-1459 (1984) に記載されている。

また、インスリンとグルカゴンが肝再生に重要な因子であることが、Advances in Enzyme Regulation, 13, 281-293 (1975) に記載され、わが国では沖田等がGastroenterolog

i a J a p a n . , 1 4 , 4 5 3 (1 9 7 9) で劇症肝炎にインスリン・グルカゴン療法を応用して以来、臨床例に汎用されている。

他方、分岐鎖アミノ酸であるバリン、イソロイシン、ロイシンによる肝性脳症や敗血症性脳症の改善あるいは侵襲時の蛋白節約効果が報告され、アミノ酸液としてヘパトアミン（登録商標）、ヘパン（登録商標）、アミノレバン（登録商標）、アミパレン（登録商標）、アミゼート（登録商標）およびアミニック（登録商標）が市販されている。しかしながら、バリンが肝細胞再生作用を有することは全く知られていない。

近年、肝細胞増殖因子（H G F）は、ラットおよびヒトより精製され、c D N Aのクローニングにも成功し、初代培養肝細胞増殖作用、肝障害に伴う血中H G F活性の上昇やH G F m R N Aの発現誘導の結果等から将来臨床応用されることが期待されるが、実用化には至っていない。

現在、日本で肝再生効果を有するとされる唯一の治療はグルカゴン・インスリン療法（G I 療法）である。しかしながら、欧米においてこのG I 療法はいまだ 15 その有効性が認められるまでには至っていない。

発明の開示

本発明は軽度から重度の肝障害を伴う肝疾患に対し、安全で肝再生効果の強い薬剤を提供することを目的とする。

20 本発明者等は、上記目的を達成するため、ラットを用いた実験により、通常用いられている高カロリー輸液にバリンを添加し、バリン濃度を増加させ、それに伴う肝再生重量を測定し、病理組織学的検索等について、詳細に検討した。その結果、バリンが顕著に肝再生を起こすことを見出し、本発明を完成した。

本発明で用いられるバリンは市販品、合成品、その他製法に関係なく使用され 25 う。またD体、L体およびD L体のいずれも使用可能である。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられるバリンを肝再生治療剤として使用する場合は、通常、静脈

内投与で行うのが好ましいが、他に経口投与、経腸投与等でも可能である。また、本発明で用いるバリンはこれのみを含む製剤として単独で用いることもできるが、好ましくは高カロリー輸液剤のような輸液製剤と併用して用いるか若しくは輸液製剤に添加して用いるのがよい。

- 5 投与剤型としては、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、粉末剤、散剤、座剤等が考えられる。このような剤型を調製するためには医薬上許容しうる液体または固体状の適当な賦形剤、充填剤、增量剤、溶剤、乳化剤、滑沢剤、風味補正剤、香料、染料、緩衝物質等の補助剤を加えて行うのが好ましい。
- 10 本発明の肝再生治療剤は、肝炎をはじめ、肝硬変、肝癌等で肝臓を切除した患者に用いられ、その投与量は患者の性別、体型、体质、年齢および症状や用いる剤型により異なるが、末梢静脈や中心静脈からアミノ酸輸液製剤として投与する場合はバリンの濃度が0.5～5.0%、輸液に加えるアンプル剤としては1.0～10.0%、その他、経口投与および経腸投与の懸濁剤、乳剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、粉末剤、散剤、座剤等としては、5.0～100%の範囲で適宜選択できる。

尚、本発明においてバリンの濃度を表す%は、バリンが液体状の場合はw/v%を、またバリンが固体状の場合はw/w%を意味する。

【実施例】

- 20 以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

【実施例1】

バリン増量による70%部分肝切除ラットの肝再生に及ぼす効果

8～9週齢の250g前後のDonryu系雄性ラット（1群5～7匹）を用い、エーテル麻酔下で中心静脈にカテーテルを挿入・留置したあと、開腹し肝臓を約70%切除し、70%部分肝切除モデルラットを作成した。カテーテルは皮下トンネルを通して両肩甲骨間に抜き、Harness装着後、Protective coilを経て、Swivelに接続した。ラットを代謝ケージに移し、乳酸リングル液（ラクテック〔登録商標、大塚製薬株式会社製〕）で輸液馴化後、

3日間あるいは5日間、non protein colony換算で220 kcal/kg/day、ポンプによる投与速度を250ml/kg/dayに設定して、以下に示す高カロリー輸液を持続投与した。すなわち、100%群（対照群）として10%総合アミノ酸製剤（モリプロン【登録商標、森下ルセル株式会社製】）にグルコース、電解質、微量金属、ビタミンを加えた高カロリー輸液（バリン濃度=2.25g/l）を、0%群は上記対照輸液からバリンのみを欠如させた輸液（バリン濃度=0g/l）を、200%群は対照輸液に、L-バリン（日本薬局方）を添加した輸液（バリン濃度=4.50g/l）を、400%群は対照輸液にL-バリン（日本薬局方）を添加した輸液（バリン濃度=9.0 g/l）を持続投与する群に分けて実験を行った。

輸液投与終了後は体重を測定し、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈より全採血後剖検し、肝臓を採取し重量を測定した。また肝重量と体重測定結果から肝体重比を求めた。さらに肝臓はホルマリン固定し、ヘマトキシリソ・エオジン重染色標本にて病理組織学的検査を行った。尚、測定結果は平均値±標準偏差 (mean ± SD) で表し、統計学的処理はStudent's T testにてp < 0.05を有意差ありとした。肝重量と肝体重比の結果を表1に示す。

表1

| 群 | 3日間持続投与 | | | 5日間持続投与 | | |
|------------------|---------|----------------|---------------|---------|-----------------|----------------|
| | 例数 | 肝重量 (g) | 肝体重比 (%) | 例数 | 肝重量 (g) | 肝体重比 (%) |
| 0% | 5 | 5. 6 ± 0. 5 | 2. 2 ± 0. 1 | 7 | 6. 3 ± 0. 2 | 2. 4 ± 0. 1 |
| (0 g / l) # | | [1. 00] | [0. 96] | | [1. 03] | [1. 04] |
| 1 0 0 % (对照群) | 5 | 5. 6 ± 0. 3 | 2. 3 ± 0. 2 | 6 | 6. 1 ± 0. 3 | 2. 3 ± 0. 1 |
| (2. 25 g / l) | | [1. 00] | [1. 00] | | [1. 00] | [1. 00] |
| 2 0 0 % | 5 | 6. 8 ± 0. 3 ** | 2. 6 ± 0. 2 * | 6 | 7. 6 ± 0. 3 *** | 2. 9 ± 0. 2 ** |
| (4. 50 g / l) | | [1. 21] | [1. 13] | | [1. 25] | [1. 26] |
| 4 0 0 % | 5 | 7. 5 ± 0. 3 ** | 2. 9 ± 0. 1 * | 7 | 8. 6 ± 0. 3 *** | 3. 1 ± 0. 1 ** |
| (9. 00 g / l) | | [1. 34] | [1. 26] | | [1. 41] | [1. 35] |

: 高カリ一輸液中のパリソ濃度を示す。
[] 内は、対照群比

Student's T testにて統計解析
mean ± S. D. *: p < 0. 05 **: p < 0. 01 (vs対照群)

肝重量は3日間投与において対照群の 5.6 ± 0.3 gに比し、200%群の 6.8 ± 0.3 gおよび400%群の 7.5 ± 0.3 gはともに有意 ($p < 0.01$) に高値を示し、また5日間投与においても、対照群の 6.1 ± 0.3 gに比べて、200%群の 7.6 ± 0.3 gおよび400%群の 8.6 ± 0.3 gがともに有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。

さらに肝体重比においても、3日間投与で対照群の 2.3 ± 0.2 %に比し、200%群の 2.6 ± 0.2 %が有意 ($p < 0.05$) に、400%群の 2.9 ± 0.1 %も有意 ($p < 0.01$) に高く、また5日間投与では対照群の 2.3 ± 0.1 %に比べて、200%群の 2.9 ± 0.2 %および400%群の 3.1 ± 0.1 %がともに有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。

肝臓の病理組織学的検査では、0%群において肝細胞のグリコーゲン野拡張と空胞形成が顕著であったが、その他の群では全例異常は認められず、正常な形態像を示した。

【実施例2】

15 前脂肪細胞の増殖におけるバリンの影響

C3H系雌性マウス皮膚由来の前脂肪細胞を用い、バリンの細胞増殖におよぼす影響を調べた。前脂肪細胞を 1×10^4 個/well、 2.5×10^4 個/wellで96穴平底プレートに培養し、バリン濃度を $80\text{mg}/1$ 、 $160\text{mg}/1$ 、 $320\text{mg}/1$ とし、 ^3H チミジンをパルスし、シンチレーションカウンターにてチミジンの取り込みを測定した。培地はRPMI 1640を用いた。結果を表2に示す。

表2

| 群 | [³ H] チミジンの取り込み量 (c p m) | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| | 細胞数 1×10^4 個 | 細胞数 2.5×10^4 個 |
| 100% (80 mg/l) * | 1203.3 | 2771.1 |
| 200% (160 mg/l) * | 1314.4 | 3441.1 |
| 400% (320 mg/l) * | 3180.0 | 4678.9 |

* : 培養液中のバリン濃度を示す。

表2から明かなように、バリン濃度の増加に伴い、チミジンの取り込みの増加が認められた。

【実施例3】

初代培養肝細胞の増殖におけるバリンの効果

5 8~9週齢の250 g前後のDonryu系雄性ラットを用い、エーテル麻酔下で開腹し、肝臓を70%切除した。3日後、麻酔下でラット肝臓をコラーゲンで灌流し、遊離した肝細胞を採取した。肝細胞を 2×10^4 個/wellで、コラーゲンでコートした92穴平底プレートに播種した。バリン濃度を50 mg/l、100 mg/l、200 mg/lとし、36時間培養後、³Hチミジンをパルスし、シンチレーションカウンターにて、チミジンの取り込みを測定した。培地はWilliams Media Eを用い、10%FCS、 10^{-8} M·dexameethazone、 10^{-7} M·insulinとした。チミジン取り込みの結果を表3に示す。

表3

| 群 | [³ H] チミジン取り込み量 (c p m) |
|----------------------|-------------------------------------|
| | 細胞数 2×10^4 個 |
| 100% (50 mg/l) * | 1276.2 |
| 200% (100 mg/l) * | 1339.2 |
| 400% (200 mg/l) * | 1991.5 |

* : 培養液中のバリン濃度を示す。

表3から明かなように、バリン濃度の増加に伴い、初代培養肝細胞のチミジンの取り込みの増加が認められ、バリンによる培養肝細胞増殖への効果が認められた。

5 産業上の利用可能性

- 本発明の肝再生治療剤は、肝炎、脂肪肝および薬剤性肝障害における肝障害に対し、肝再生を促し、正常な肝機能を回復する効果がある。胆嚢癌、肝癌、転移性肝癌等により肝切除を施行した患者に、早期に肝再生を誘導し、速やかに術後回復を可能にする。この作用は高カロリー輸液剤と併用して用いることにより、
 10 さらに高められ、慢性肝炎や肝硬変患者の肝切除においても、速やかな肝再生を示し、安全な手術、早期術後回復を可能にする。

請求の範囲

1. バリンを有効成分として含有することを特徴とする肝再生治療剤。
2. バリンがL-バリンである請求項1記載の肝再生治療剤。
- 5 3. 輸液製剤である請求項1または2記載の肝再生治療剤。
4. バリン濃度が0.5～10.0%である請求項1～3のいずれかに記載の肝再生治療剤。
5. バリン濃度が0.5～5.0%である請求項4記載の肝再生治療剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K31/195, A61K9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K31/195, A61K9/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | Journal of Japan Vein-Enteral Nutrition Research Society, No. 4 (1989), Pages 104 to 107 | 1-5 |
| A | JP, 54-89014, A (Leopold & Co., Chem. Pharm. Fabrik Gesellshaft m. b. H.), July 14, 1979 (14. 07. 79) & US, 4259353, A & GB, 2007503, A | 1-5 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search August 4, 1995 (04. 08. 95) | Date of mailing of the international search report August 22, 1995 (22. 08. 95) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No. | Authorized officer Telephone No. |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 95/01136

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int CL⁶ A 61K 31/195, A 61K 9/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int CL⁶ A 61K 31/195, A 61K 9/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y | 日本静脈・経腸栄養研究会誌, No. 4 (1989), 第104~107頁 | 1-5 |
| A | JP, 54-89014, A (Leopold & Co., Chem. Pharm. Fabrik Gesellschaft m.b.H.), 14. 7月 1979 (14. 07. 79) & US, 4259353, A&GB, 2007503, A | 1-5 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日

若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献

(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の
の後に公表された文献「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.08.95

国際調査報告の発送日

22.08.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

池田正人

4 C 9 4 5 5

電話番号 03-3581-1101 内線

3453